



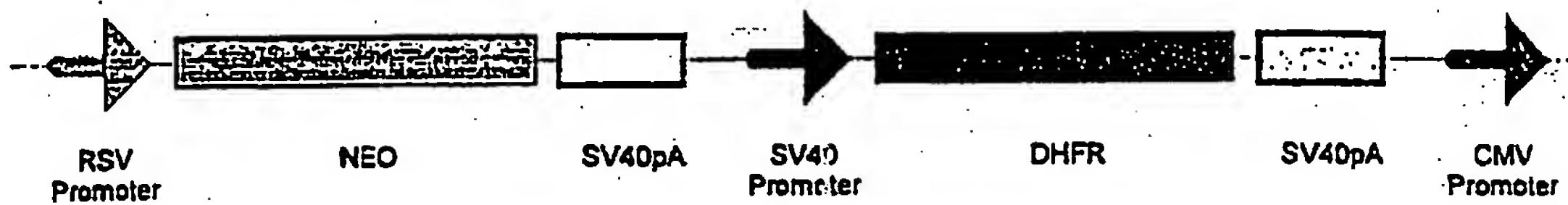
(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/12, 15/85, 15/10, C07K 14/505		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/05267 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. Februar 1999 (04.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/04584 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. Juli 1998 (22.07.98)		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(30) Prioritätsdaten: 97112640.4 23. Juli 1997 (23.07.97) EP 97121073.7 1. Dezember 1997 (01.12.97) EP 09/113,692 10. Juli 1998 (10.07.98) US		(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112-132, D-68305 Mannheim (DE).	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRANDT, Michael [DE/DE]; Faltergatter 29, D-82393 Iffeldorf (DE). FRANZE, Reinhard [DE/DE]; Am Schwadergraben 11, D-82377 Penzberg (DE). PESSARA, Ulrich [DE/DE]; Bärenmühle 1, D-82362 Weilheim (DE).		(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).	

(54) Title: IDENTIFICATION OF HUMAN CELL LINES FOR THE PRODUCTION OF HUMAN PROTEINS BY ENDOGENOUS GENE ACTIVATION

(54) Bezeichnung: IDENTIFIZIERUNG HUMANER ZELLINNEN ZUR PRODUKTION HUMANER PROTEINE DURCH ENDOGENE GENAKTIVIERUNG

GENE ACTIVATION SEQUENCE

Genaktivierungssequenz:



(57) Abstract

A process for selecting human cells for the production of human proteins by endogenous gene activation allows human proteins to be produced in economically feasible quantities and in a form suitable for producing a pharmaceutical composition. Also disclosed is a process for producing human proteins in a cell line identified in this manner.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Auswahl humaner Zellen für die Herstellung humaner Proteine durch endogene Genaktivierung, um humane Proteine in wirtschaftlichen Ausbeuten und in einer Form zu produzieren, die zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats geeignet ist. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung humaner Proteine in einer auf diese Weise identifizierten Zelllinie.

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号
特表2001-511342
(P2001-511342A)

(43)公表日 平成13年8月14日(2001.8.14)

(51)Int.Cl.⁷

C 12 N 15/09
5/10

識別記号

F I

テ-マコ-ト(参考)

C 12 N 15/00
5/00

A 4 B 0 2 4
B 4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全35頁)

(21)出願番号 特願2000-504242(P2000-504242)
(86) (22)出願日 平成10年7月22日(1998.7.22)
(85)翻訳文提出日 平成12年1月24日(2000.1.24)
(86)国際出願番号 PCT/EP98/04584
(87)国際公開番号 WO99/05267
(87)国際公開日 平成11年2月4日(1999.2.4)
(31)優先権主張番号 97112640.4
(32)優先日 平成9年7月23日(1997.7.23)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(E P)
(31)優先権主張番号 97121073.7
(32)優先日 平成9年12月1日(1997.12.1)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(E P)

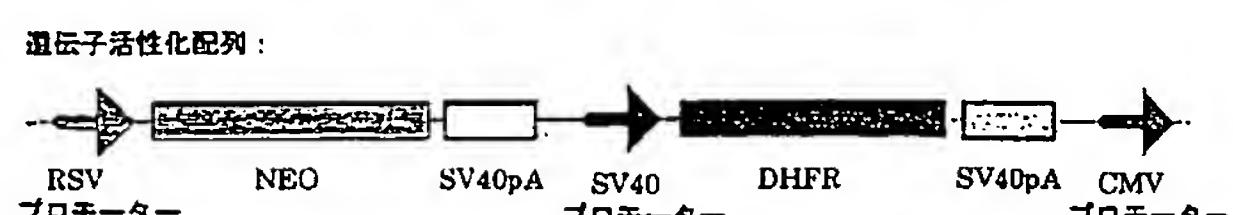
(71)出願人 ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベーハー
ドイツ国 マンハイム-ワルドホフ サンドフォーフェル ストラッセ 112-132
(72)発明者 プラント ミハエル
ドイツ国 イフェルドルフ フアルテルガッテル 29
(72)発明者 フランツェ レインハルト
ドイツ国 ペンツブルグ アム スワデルグラベン 11
(74)代理人 弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】内因性遺伝子の活性化によるヒト蛋白質の生産のためのヒト細胞株の同定

(57)【要約】

本発明は、薬学的組成物の生産に適する形態のヒト蛋白質を経済的な収量で生産するために、内因性遺伝子の活性化によってヒト蛋白質を生産するためのヒト細胞の選択方法に関するものである。本発明は、このようにして同定される細胞株において、ヒト蛋白質を生産する方法にも関する。



BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) ヒト細胞株を以下の特徴の存在について試験する：

- (i) 所望の核酸配列を持つ標的遺伝子、
 - (ii) 浮遊培養で細胞数が14日以内に少なくとも5回の倍加、および
 - (iii) 無血清培地で細胞数が14日以内に少なくとも5回の倍加、ならびに
- (b) (i)、(ii)および(iii)の特徴を満たす細胞株を、内因性標的遺伝子の活性化の出発細胞株として使用することを特徴とする、細胞中に存在する標的遺伝子を内因的に活性化することによるヒト蛋白質の調製のための、ヒト細胞株の選択方法。

【請求項2】 (iv) 培地中で1週間に16から256の細胞数の倍加をするような世代時間有するヒト細胞株を用いることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項3】 培地中で1週間に64から128の細胞数の倍加をするヒト細胞株を用いることを特徴とする、請求項2記載の方法。

【請求項4】 (v) 標的遺伝子の内因性発現が実質的でないヒト細胞株を用いることを特徴とする、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】 (vi) 標的遺伝子の染色体上のコピー数が2を超えるヒト細胞株を用いることを特徴とする、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】 (vii) 天然に存在する標的蛋白質に匹敵するグリコシル化パターンを持つ細胞蛋白質を合成するヒト細胞株を用いることを特徴とする、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】 (viii) 検出可能な感染性汚染を持たないヒト細胞株を用いることを特徴とする、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】 請求項1で定義された特徴(i)、(ii)および(iii)を満たす細胞株を用いることを特徴とする、ヒト細胞株中の内因性遺伝子活性化によるヒト蛋白質の調製方法。

【請求項9】 請求項2、4、5、6および7のいずれか一項に定義される特徴(iv)、(v)、(vi)、(vii)および(viii)の少なくとも1つをさらに満たす細胞株を用いることを特徴とする、請求項8記載の方法。

【請求項10】 EPO、TPO、コロニー刺激因子、血液凝固に影響を与える蛋白質、インターフェロン、インターロイキン、ケモカイン、神経栄養因子、骨成長に影響を与える蛋白質、ヘッジホッグ蛋白質、腫瘍増殖因子、成長ホルモン、ACTH、エンセファリン、エンドルフィン、受容体、および他の蛋白質結合蛋白質から選択されるヒトの因子の調製のための、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】 EPOの調製のための、請求項10記載の方法。

【請求項12】 活性化標的遺伝子にコードされるポリペプチドを得るために、細胞中に内因的に存在する標的遺伝子の活性化の後における、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法によって同定されるヒト細胞株の使用。

【請求項13】 大型発酵槽中でポリペプチドを得るための、請求項12記載の使用。

【請求項14】 ヒト細胞で活性な異種プロモーターに機能的に連結した内因性遺伝子を1コピー含み、内因性遺伝子にコードされるポリペプチドを、 10^6 細胞/24時間にて少なくとも200 ng生産する能力を持つことを特徴とするヒト細胞株。

【請求項15】 ヒト細胞中で活性な異種プロモーターにそれが機能的に連結した内因性遺伝子を数コピー含み、内因性遺伝子にコードされるポリペプチドを、 10^6 細胞/24時間にて少なくとも1000 ng生産する能力を持つことを特徴とする、請求項14記載の細胞の遺伝子増幅によって得られるヒト細胞株。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、薬学的組成物の生産に適する形態のヒト蛋白質を経済的な収量で生産するために、内因性遺伝子の活性化によってヒト蛋白質を生産するためのヒト細胞の選択方法に関するものである。本発明は、このようにして同定される細胞株において、ヒト蛋白質を調製する方法にも関する。

【0002】

ヒト細胞株における内因性遺伝子の活性化によるヒト蛋白質の調製は、既知である。例えば、国際公開公報第93/09222号、国際公開公報第94/12650号および国際公開公報第95/31560号は、内因性遺伝子の活性化によるヒトの細胞株中のエリスロポエチンおよび他のヒト蛋白質の生産を記述している。

【0003】

しかし、該文献では、ヒト蛋白質の調製に使用される細胞株の選択に、特定の基準が観察されるという示唆はない。したがって、生産のために選択された細胞株中で、所望のヒト蛋白質が、所望の収量と形態で、汚染なく得られるという保証はない。したがって、上述の文書では、一般にヒト蛋白質の収量が低くなっている。

【0004】

本発明の問題は、現技術水準の不都合を解消し、特に、あらかじめ決められた標的遺伝子の内因性活性化に適当なヒト出発細胞株の選択の基準を提供することであった。

【0005】

この問題は、以下のような特徴を持つ、細胞株中に存在する内因性標的遺伝子の活性化によるヒト蛋白質の調製のためのヒト細胞株の選択方法によって、解決できる：

- (a) ヒト細胞株の以下の特徴の存在を試験する：
 - (i) 所望の核酸配列を持つ標的遺伝子、
 - (ii) 浮遊培養において細胞数が14日以内に少なくとも5回の倍加、および
 - (iii) 無血清培地において細胞数が14日以内に少なくとも5回の倍加、ならびに

(b) (i)、(ii)および(iii)の特徴を持つ細胞株を、内因性標的遺伝子の活性化の出発細胞株として使用する。

【0006】

本発明に従い、遺伝子ターゲッティングによりヒト細胞株中のヒト標的遺伝子を活性化し、望ましい形態の標的蛋白質を十分な収量で生産できる細胞を得るという課題に取り組む場合には、後に標的蛋白質を大量生産するために適切な候補となるためにこの細胞株が所有している必要があるいくつかの特徴の存在について、いくつかの細胞株を試験することになる。非不死化細胞と比較して、培養可能性の点で重要な利点があるため、好ましくは不死化した細胞株、特に腫瘍細胞株が試験される。

【0007】

特徴(i)によると、ヒト細胞株では、実際に標的遺伝子、すなわち内因性遺伝子活性化によって活性化される遺伝子が、通常は天然の標的遺伝子の核酸配列である所望の核酸配列を持つかどうかを試験する。これは、永久培養される腫瘍細胞株や他の細胞株は、しばしばそのゲノムに一連の変異を持つためである。したがって、適当な細胞株の選択の1つの重要な局面は、細胞が所望の産物のために正しい遺伝子を持つかどうかである。配列の決定は、通常の方法で細胞を培養して、標的遺伝子の配列決定をすることによって、実行できる。必要ならば、配列決定の前に、PCRまたは他の增幅方法によって、標的遺伝子の増幅を行なうことができる。

【0008】

細胞の選択のもう1つの重要な特徴は、浮遊培養の可能性である。懸濁細胞は、発酵槽培養しやすく、発酵槽培養は、例えば10 Lから50,000 Lの容量の大型発酵槽のような大きなサイズに適合させやすい。したがって、選択された細胞は、懸濁細胞であるか、または懸濁細胞に簡単に適応するものである必要がある。このために、細胞は連続攪拌して14日間培養する。この期間の間に細胞数が少なく述べても5回の倍加を示せば、細胞は浮遊培養に適すると考えられる。細胞数の倍加の回数は、例えば、細胞の計数または細胞懸濁液の光学密度の測定によって、細胞数を定期的に決定することによって、決定できる。

【0009】

ヒト細胞の選択のもう1つの重要な特徴は、無血清培地での培養可能性である。無血清培養からの蛋白質の精製の方がかなり簡単で、無血清培養ではウイルスのような動物の病原体の汚染の危険がないため、選択された細胞は、無血清培地で増殖する必要がある。このために、細胞は無血清培地（例、Boehringer Mannheim社のITS添加RPMI 1650）を用いて培養器中で1 mlあたり $1 \sim 10 \times 10^5$ 細胞の密度で14日間培養する。この培養期間に、細胞の計数によって決定される細胞数が少なくとも5回の倍加を示せば、細胞は無血清培養に適すると考えられる。

【0010】

もう1つの重要な特徴で、本発明によると好ましい特徴は、世代時間(iv)である。選択された細胞は、10%ウシ全血清添加DMEMまたは10%ウシ全血清添加RPMI 1640のような培地中で、高度に増殖する必要がある。すなわち、1週間の培養で、10~256、好ましくは64~128の細胞数の倍加が必要である。このために、1 mlあたり $0.1 \sim 10 \times 10^5$ 細胞、好ましくは $0.5 \sim 2 \times 10^5$ 細胞の濃度で細胞をディッシュに播き、トリプシン処理後または処理なしで、細胞チャンバーによって細胞の計測を行なう。十分に世代時間が短い細胞は、内因性遺伝子の活性化によるヒト蛋白質の大量生産に特に適している。

【0011】

もう1つの好ましい特徴は、標的遺伝子の検出可能な内因性発現、すなわち転写および翻訳がないことである(v)。好ましくは、内因性遺伝子の活性化には、標的遺伝子の内因性発現が基本的に存在しない細胞株が選択される。このために、 $0.01 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/ml、好ましくは培地1 mlあたり $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞の細胞密度で24時間、細胞を播くことができる。例えば24時間のような所定の時間後に、細胞の上清を取り出し、細胞を破棄し、例えばELISAのような既知の試験方法によって細胞上清中の標的蛋白質の含有量を決定する。EP0の場合は、検出限界は例えば10 pg/EP0/mlである。 10^6 細胞/mlの播種で蛋白質を10 pg未満しか合成しない細胞は、生産しないと見なされ、特に適している。

【0012】

もう1つ別の重要で好ましい特徴は、選択される細胞中での標的遺伝子の多染

色体性である(vi)。細胞中に標的遺伝子のコピーが2つよりも多ければ、相同組換えにおける収量が大幅に上昇する。7番染色体に遺伝子があるEP0の生産では、7番染色体を3対持つNama Iwa (Nadkarniら、Cancer 23 (1969), 64-79)またはHeLa S3 (Puckら、J. Exp. Med. 103 (1956), 173-284)の細胞が、特に適していることが示された。7番染色体のコピー数が増加している他の細胞株の例には、結腸腺癌細胞株SW-480 (ATCC CCL-228; Leibovitzら、Cancer Res. 36 (1976), 45 62-4567)、悪性メラノーマ細胞株SK-MEL-3 (ATCC HTB 69; FoghおよびTrempe、「インビトロのヒト腫瘍細胞(Human Tumor Cells in vitro)」, pp115-159、J. Fogh編、Plenum Press, New York 1975)、結腸腺癌細胞Colo-320 (ATCC CCL-220; Quinnら、Cancer Res. 39 (1979), 4914-4924)、メラノーマ細胞株MEL-HO (DSM ACC 62; Holzmannら、Int. J. Cancer 41 (1988), 542-547)および腎臓癌細胞A-498 (DSM ACC 55; Giardら、J. Natl. Cancer Inst. 51 (1973), 1417-1423)がある。

【0013】

細胞株のゲノム中の染色体数の確認は、特定の染色体および/または標的遺伝子の遺伝子座に特異的なDNAプローブを用いて行なうことができる。

【0014】

内因性遺伝子の活性化に使用する出発細胞株のもう1つの好ましい特徴は、所望の標的蛋白質の正しくグリコシル化されていることである(vii)。好ましくは、特にシアル酸残基の数について、天然に存在する標的蛋白質に匹敵するグリコシル化パターンを持つ標的蛋白質を合成するヒト細胞株が使用される。正しいグリコシル化の存在は、好ましくは、細胞中で活性なプロモーターの制御下に所望の標的遺伝子を持つ染色体外ベクターによって、細胞を一時的にトランスフェクトすることによって、試験できる。標的遺伝子の一時的な発現後に、細胞上清および/または細胞抽出物を、等電点電気泳動によって分析する。EP0の例では、正しいグリコシル化の存在は、非常に明らかである。例えば大腸菌細胞の組換えEP0のような非グリコシル化EP0は、インビトロの実験ではグリコシル化EP0に匹敵する活性を持つ。しかし、インビトロの実験では、非グリコシル化EP0は、効率がかなり低い。出発細胞株が正しいグリコシル化を持つEP0を生産できるかどうか

を決定するために、尿のEPOと比較できるが、またヒトで活性なグリコシル化の型を持つことが知られており、尿のEPOとほぼ同一のグリコシル化を持つCHO細胞由来の組換えEPOと比較することもできる。グリコシル化の比較は、好ましくは等電点電気泳動によって行なう。

【0015】

ヒト細胞株の選択のためのもう1つの好ましい特徴は、研究される細胞株に、例えば感染性ウイルス粒子やマイコプラズマの汚染がないことである(vii)。ウイルスの汚染の存在は、細胞培養、インビボ分析、および/または特定のウイルス蛋白質の検出によって、調べられる。

【0016】

本発明は、ヒト細胞株における内因性遺伝子の活性化によるヒト蛋白質の調製方法にも関するもので、上述の(i)、(ii)および(iii)特徴を満足し、さらに上述の(iv)、(v)、(vi)および(vii)の特徴のうちの少なくとも1つも満足する細胞株を使用するという特徴を持つものである。

【0017】

本発明の方法は、EPO、トロンボポエチン(TPO)、G-CSFまたはGM-CSFのようなコロニー刺激因子、tPAのような血液凝固に影響を与える蛋白質、IFN- α 、IFN- β またはIFN- γ のようなインターフェロン、IL-1からIL-18のようなインターロイキン、MIPのようなケモカイン、NGFまたはBDNFのような神経栄養因子、IFG-BPのような骨成長に影響を与える蛋白質、ヘッジホッグ蛋白質、TGF- β のような腫瘍増殖因子、HGHのような成長ホルモン、ACTH、エンセファリン、エンドルフィン、可溶性および/または膜結合型のインターロイキンまたはインスリン受容体のような受容体、および他の蛋白質結合蛋白質のような、ヒトの因子の調製に特に使用される。特に好ましいのは、EPOの調製プロセスである。

【0018】

内因性遺伝子の活性化自体は既知の方法によって行なうことができ、好ましくは以下の段階を含む：

- (a) 所望の核酸配列を持つ内因性の標的遺伝子を少なくとも1コピー持ち、本発明

の選択基準によって標的遺伝子の発現に適すると同定されたヒト出発細胞株の調製。

- (b) 以下を含むDNAコンストラクトによる、細胞のトランスフェクション：
 - (i) 相同組換えを可能にするために、標的遺伝子座の領域に相同な2つのDNAフランкиング配列、
 - (ii) ポジティブ選択マーカー遺伝子、
 - (iii) 必要ならばネガティブ選択マーカー遺伝子、
 - (iv) 必要ならば增幅遺伝子、および
 - (v) ヒト細胞で活性な、異種発現制御配列。
- (c) ポジティブ選択マーカー遺伝子の存在下と、選択的にネガティブマーカー遺伝子の非存在下で選択が起きる条件のもとでの、トランスフェクトされた細胞の培養、
- (d) 段階にしたがった選択可能な細胞の分析、
- (e) 所望の標的蛋白質を生産する細胞の同定、ならびに
- (f) 必要ならば選択された細胞中での標的遺伝子の増幅。

【0019】

所望のヒト蛋白質を生産する細胞の調製に使用するDNAコンストラクトは、標的遺伝子座の領域に相同な2つのフランキングDNA配列を含む。適切なフランキング配列は、例えば国際公開公報第90/11354号および国際公開公報第91/09955号に記載される方法によって選択される。好ましくは、フランキング配列は各々少なくとも150 bpの長さを持つ。

【0020】

特に好ましくは相同DNA配列は、標的遺伝子の5'領域、例、5'非翻訳配列、シグナル配列をコードするエクソン、およびこの領域に存在するイントロンから、選択される。

【0021】

ポジティブ選択マーカー遺伝子は、発現されると選択可能な表現型、例、抗生物質耐性、栄養要求性等を示す、真核細胞に適した任意の選択マーカー遺伝子であり得る。特に好ましいポジティブ選択マーカーは、ネオマイシンホスホトラン

スフェラーゼ遺伝子である。

【0022】

選択的に、選択薬剤の存在下でそれを発現する細胞が破壊される、例えばHSVチミジンキナーゼ遺伝子のような、ネガティブ選択マーカー遺伝子も存在し得る。ネガティブ選択マーカー遺伝子は、2つのフランкиング相同配列領域の外側に位置する。

【0023】

ヒト細胞中で活性化される内因性標的遺伝子の増幅が望ましい場合、DNAコンストラクトには増幅遺伝子が含まれる。適切な増幅遺伝子の例には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、およびオルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子等がある。特に好ましい増幅遺伝子は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子で、特に、野生型遺伝子よりも選択薬剤（メトレキセート）に対する感受性が高いジヒドロ葉酸レダクターゼ-アルギニン変異（Simonsenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983), 2495) をコードする遺伝子である。

【0024】

さらに、内因性遺伝子の活性化に使用されるDNAコンストラクトには、ヒト細胞で活性な、異種発現制御配列が含まれる。発現制御配列には、プロモーターと、好ましくは、例えばエンハンサーのような、別の発現改善配列が含まれる。プロモーターは、コントロール可能または構成性のプロモーターで良い。好ましくは、プロモーターは強力なウイルスプロモーター、例、SV40またはCMVプロモーターである。特に好ましいのは、CMVプロモーター/エンハンサーである。

【0025】

さらに本発明は、活性化標的遺伝子にコードされるポリペプチドを得るために、好ましくは例えば大型発酵槽を用いた大量プロセスでポリペプチドを得るために、細胞に内在的に存在する標的遺伝子を活性化した後に、上述の方法によって同定されるヒト細胞株の使用することにも関する。

【0026】

本発明のさらにもう1つの主題は、ヒト細胞中で活性な異種発現制御配列に機能的に連結した内因性遺伝子のコピーを含み、あらかじめ遺伝子増幅をしなくて

も、その内因性遺伝子にコードされるポリペプチドを 10^6 細胞/24時間にて少なくとも200 ng生産する能力がある、ヒト細胞である。好ましくは、本発明のヒト細胞は、 10^6 細胞/24時間にて200～3000 ngのポリペプチドの生産能力があり、最も好ましくは 10^6 細胞/24時間にて1000～3000 ngのポリペプチドの生産能力がある。

【0027】

最後に、本発明のもう1つの主題は、上述の細胞から遺伝子增幅によって得られるヒト細胞で、各々がヒト細胞中で活性な異種発現制御配列に機能的に連結した内因性遺伝子のコピーをいくつか含み、その内因性遺伝子にコードされるポリペプチドを 10^6 細胞/24時間にて少なくとも1000 ng生産する能力のある、ヒト細胞である。特に好ましくは、遺伝子增幅によって得られるヒト細胞株は、 10^6 細胞/24時間にて1000～25000 ngのポリペプチド、および最も好ましくは 10^6 細胞/24時間にて5000～25000のポリペプチドを生産する能力がある。

【0028】

本発明に記載される細胞の例は、EPO生産クローン「Aladdin」であり、これはブダペスト条約の規定に従い、1997年7月15日に、ファイル番号DSM ACC 2320としてDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (Mascheroder Weg 1b, 38124 Brunswick) に寄託された。

【0029】

本発明は以下の実施例および図および配列によってさらに説明される。

【0030】

実施例

実施例1 選択方法

1.1 世代時間の決定

試験された細胞株は、それぞれ10% FCS添加DMEMまたは10% FSC添加RPMI 1640中に1 mlあたり $0.1\sim5\times10^5$ 細胞、好ましくは1 mlあたり $0.5\sim2\times10^5$ 細胞の濃度で培養ディッシュに播種し、例えばATCCによりその特定の細胞に推奨される培地中で、適切な条件下で培養し、細胞数は、例えばNeubauerのような計数チャンバーを用いて、トリプシン処理ありまたは処理なしで2～3日ごとに決定した。培

養後1週間以内に細胞数が16～256に倍加した細胞、好ましくは64～128に倍加した細胞は、陽性（+、++または+++）と評価された。

【0031】

1.2. 浮遊培養の可能性

浮遊培養の可能性を決定するために、細胞を対応する付属装置を装着したBecton Dickinson Sp inner中で、37°Cおよび7% CO₂として、培地（1.1参照、例えばウシ胎仔血清のような血清の添加ありまたはなし）中で、連続的に攪拌しながら14日間培養した。この間に少なくとも5回の倍加をした細胞は、浮遊培養に適する（+）と評価された。

【0032】

1.3. 無血清培地での培養可能性

無血清培地での細胞の培養可能性を決定するために、細胞を1.1と同じ条件下で、ATCCによってその特定の細胞に推奨される基礎培地（すなわち血清の添加なし）およびITS（Boehringer Mannheim社、カタログ番号1074547）添加で、培養器中で1～10 × 10⁵細胞/mlの密度で14日間培養した。この間に少なくとも5回の倍加（細胞の計数によって決定）をした細胞は、無血清培養に適すると評価された。

【0033】

1.4. 標的遺伝子の内因性発現の決定

標的蛋白質が選択された細胞株中で内在的に生産されるかどうかを決定するために、細胞を0.01～2 × 10⁶細胞/ml培地、好ましくは0.5～1 × 10⁶細胞/mlの密度で24時間までいた。24時間後に細胞上清を取り出し、細胞を破棄し、例えば特定の蛋白質に特異的な免疫アッセイのような既知の試験方法によって、細胞上清中の細胞蛋白質の含有量を決定した。

【0034】

EP0の場合、含有量はELISAによって決定された。このためにストレプトアビジョンでコートしたマイクロタイタープレートをビオチン化抗EP0抗体（Boehringer Mannheim）でコートし、蛋白質を含む溶液（1% w/v）とインキュベートして非特異的結合をブロックした。その後、培養上清0.1 mlを添加し、一晩インキュベー

トした。洗浄後、ペルオキシダーゼ結合抗EPOモノクローナル抗体 (Boehringer Mannheim) を2時間添加した。ペルオキシダーゼ反応は基質としてABTS (登録商標) を用いてPerkin-Elmerフォトメーターで405 nmで測定した。

【0035】

この試験におけるEPOの検出限界は10 pg EPO/mlだった。10⁶細胞/mlの播種で10 pg EPO/ml未満しか生産しない細胞は、非生産であり、適する (+) と評価された。

【0036】

1.5. 標的遺伝子のコピー数の決定

細胞株中の標的遺伝子のコピー数を決定するため、約10⁸細胞からヒトゲノムDNAを単離し、定量した (Sambrookら、「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press)。それぞれ例えばAge IおよびAsc IまたはBamHI、HindIIIおよびSallのような制限酵素でDNAを切断した後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片をサイズによって分別し、最後にナイロンメンブレンに移して固定した。

【0037】

固定したDNAに、標的遺伝子座または標的遺伝子が存在する染色体に特異的なジゴキシゲニン標識DNAプローブをハイブリダイズさせ、厳密な条件下で洗浄した。特異的なハイブリダイゼーションシグナルは、感光性フィルムを用いて化学ルミネセンスを用いて検出した。

【0038】

1.6. 標的遺伝子の核酸配列の決定

ゲノムDNAは、DNA単離キット (例、QIAGEN血液および細胞培養DNAキット) を用いて約10⁷細胞から単離された。

【0039】

標的遺伝子の増幅には、1対のPCRプライマーが使用された。プライマーの配列は、標的遺伝子のコード領域に隣接する配列に相補的だった。したがって、標的遺伝子のコード領域全体を増幅することができた。

【0040】

PCR産物は、直接に配列分析を行なうか、ベクターにクローニングしてから配列決定をした。標的遺伝子のインtron領域の配列に相補的な配列を持つシーケンシングプライマーを使用し、標的遺伝子のエクソン領域の配列が完全に得られるようにした。配列決定は、例えば「プリズム・レディ・リアクション・ダイ・ターミネーター・サイクル・シークエンス (Prism (登録商標) Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing)」キット (PE/ABI、米国フォレストティ) を用いて、製造元の指示にしたがって、PE/ABI自動シーケンサーで行なった。

【0041】

1.7. グリコシリ化パターンの決定

EPOのグリコシリ化パターンを決定するために、試験する細胞株に、ヒトEPO遺伝子配列の4 kbのHind III/EcoRI断片をSV40プロモーターの制御下に含むプラスミドpEP0227をトランスフェクトした (Jacobsら、Nature 313 (1985), 806; Lee-Huangら、Gene 128 (1993), 272)。細胞は、市販の試薬キットを用いて、製造元の指示に従って、リポフェクタミンの存在下でトランスフェクトした。2~5日後に得られた細胞上清のEPO含有量をELISAで決定した。

【0042】

細胞上清を濃縮し、等電点電気泳動法によって既知のEPO産物と比較した (Righetti, P.G., 「等電点電気泳動：理論、方法および応用 (Isoelectric Focusing : Theory, Methodology and Applications)」Work, T.S., Burdon, R.H.編、Elsevier Biomedical Press, Amsterdam (1983))。尿EPOのような既知のEPO産物に匹敵するグリコシリ化を示したヒト細胞は、適する (+) と評価された。

【0043】

1.8. ウイルス汚染の決定

1.8.1. 細胞培養による分析

試験するヒト細胞株の感染性ウイルス汚染を検出するため、細胞溶解物を、細胞変性効果を検出するために検出細胞株とインキュベートした。さらに、血球吸着分析も行なった。

【0044】

溶解物を調製するために、1 mlの緩衝液に 10^6 細胞を入れた懸濁液を、急速な

凍結融解によって溶解させた。細胞残渣を遠心によって分離し、上清を検出細胞株に加えた。使用した検出細胞株はHepG2 (ATCC HB-8065; Nature 282 (1979), 615-616)、MRC-5 (ATCC-1587) およびVero (ATCC CCL-171; Jacobs, Nature 227 (1970), 168-170) だった。ポリオSVおよびインフルエンザタイプのウイルスが、陽性対照として使用された。陰性対照は、溶解物なしで培養した検出細胞株だった。細胞変性効果を検出するために、検出細胞株は少なくとも14日間、定期的に調べた。

【0045】

血球吸着分析のためには、細胞溶解物および対照とインキュベートされていた Vero細胞を、7日後にニワトリ、ブタ、ヒトの赤血球で処理した。培養細胞の単層に赤血球が接着すれば、培養物にウイルス汚染があることを示す。

【0046】

1.8.2. インビオ分析

試験する細胞株の溶解物を1.8.1.のようにして調製し、0.1 mlを新生マウスの腹腔内または大脳半球間に注射した。14日間にわたり、マウスの罹患率と死亡率を観察した。

【0047】

1.8.3. ウィルス蛋白質の特異的検出

エプスタイン・バーウィルス蛋白質（核蛋白質またはキャップシド抗原）のような特定のウィルス蛋白質の存在は、EBV陽性バンドのヒト血清を、試験する細胞株の固定化細胞に与えて試験した。その後、補体および対応する抗ヒト補体C3フ ルオレセイン結合体（核抗原の検出用）および抗ヒトグロブリンフルオレセイン（キャップシド抗原の検出用）を投与して、ウイルス抗原の検出を行なった。

【0048】

実施例2. 選択結果

第1項に述べた方法によって、ヒト細胞株HepG2、HT1080、Namalwa、HeLaおよびHeLaS3が試験された。結果は以下の表1に示されている。

【0049】

【表1】

	HepG2	HT1080	Namalwa	HeLa	HeLaS3
増殖					
倍加時間	+	++	++	+++	+++
浮遊培養	-	+	+	+/-	+
無血清の可能性	+/-	+	+	+	+
EPO生産					
内因性	+	-	-	-	-
一過性/ml	53 ng	65 ng	70 ng	100 ng	480 ng
EPOグリコシル化 (一過性)	-	+	+	+	+
ウイルス感染 汚染試験	試験せず	なし	なし	試験せず	なし

【0050】

表1から、細胞株HT1080、NamalwaおよびHeLaS3は、EPOの内因性遺伝子活性化に適すると考えられることが分かる。NamalwaおよびHeLaS3は特に適している。

【0051】

実施例3. EPO相同性領域のクローニング

EPO遺伝子の相同性領域は、胎盤のゲノムDNA (Boehringer Mannheim) を用いてPCRによって、增幅された。EPO遺伝子の5'非翻訳配列、エクソン1およびイントロン1の領域からの長さ6.3 kbの相同性領域から、2つのPCR産物が調製された(図1)。PCR産物1の作製に使用されたプライマーは、以下の配列を持っていた：5'-CGC GGC GGA TCC CAG GGA GCT GGG TTG ACC GG-3' (配列番号：1) および5'-GGC CGC GAA TTC TCC CCT GGC CGG GGT CCC TCA GC-3' (配列番号：2)。

PCR産物2の調製に使用されたプライマーは、以下の配列を持っていた：5'-CGC GGC GGA TCC TCT CCT CCC TCC CAA GCT CCA ATC-3' (配列番号：3) および5'-GGC CGC GAA TTC TAG AAC AGA TAG CCA GGC TGA GAG-3' (配列番号：4)。

【0052】

望ましい部分は、制限切断 (PCR産物1：HindIII、PCR産物2：HindIIIおよびEcoRV) によってPCR産物1および2から切り出し、HindIIIおよびEcoRVで切断されたベクターpCRII (Invitrogen) にクローニングした。このようにして得られた組

換えベクターは、5epopcr1000と呼ばれた（図2参照）。

【0053】

実施例4. EPO遺伝子ターゲッティングベクターの作製

4.1. NEO遺伝子、DHFR遺伝子およびCMVプロモーター/エンハンサーを含む遺伝子活性化配列（図3参照）が、EPO相同性領域を含むプラスミド5epopcr1000のAge I部位に挿入され、プラスミドp176が得られた（図4a参照）。CMVプロモーターをEPO遺伝子の翻訳出発部位にできるだけ近付けるために、制限部位Asc IおよびAge Iの間の長さ963 bpの部分が除去され（部分切断）、プラスミドp179が得られた（図4b）。

【0054】

4.2. 発現を最適化するために、EPOリーダー配列の出発Met-Gly-Val-Hisをコードするエクソン1のヌクレオチドが、合成配列Met-Ser-Ala-Hisによって置換された。この配列は、例えばSV40の制御下にヒトEPO遺伝子配列（Jacobsら、Nature 313 (1985), 806、およびLee-Huangら、Gene 128 (1993), 227）の3.5 kbのBstE II/EcoRI断片（エクソン1～5を含む）を含むプラスミドpEP0148のようなゲノムEPO DNA配列を鋳型として、対応するプライマーを用いて、増幅して得られた。このようにして、プラスミドp187が得られた（図4b）。

【0055】

4.3. プラスミドp189は、Psvtk-1 (PvuII/NarI断片)から得られた単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-TK) を、プラスミド-187に挿入して、調製された（図4c）。HSV-TK遺伝子は、CMVプロモーターに対して逆方向で、イントロン1 (EcoRV/ClaI) の3'末端にあるSV40プロモーターの制御下にあり、相同組換えのネガティブ選択になるはずである。

【0056】

4.4. プラスミドp190の作製のために、Simonsenら (Proc. Natl. Acad. Sci. US A 80 (1983) 2495) に記述されたDHFRのアルギニン変異のcDNAを含むプラスミドpHEAVYのSfiI/BglIII断片が、SfiIおよびBglIIIで切断されたプラスミドpGenak-1にサブクローニングされた。pGenak-1は、RSVプロモーターおよびターミネータ

ーとしてSV40後期ポリアデニル化部位の制御下にあるNEO遺伝子、SV40初期プロモーターおよびターミネーターとしてSV40初期ポリアデニル化部位の制御下にあるマウスDHFR遺伝子 (Kaufmannら、Mol. Cell. Bio.. 2 (1982), 1304; Okayamaら、Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 280、およびSchimke, J. Biol. Chem. 263 (1988), 5989)、およびCMVプロモーター (Boshartら、Cell 41 (1995) 521) を含む。その後、DHFRアルギニン変異をコードするcDNAを含むHpa I断片が、Hpa Iで切断されたプラスミドp189に連結され、プラスミドp190が得られた（図4d）。

【0057】

4.5. HSV-TK遺伝子を持たないトランスフェクションベクターを得るために、遺伝子活性化配列を含むプラスミドp190のAsc I/Nhe I断片が、エクソン1を含むプラスミドp187のAsc I/Nhe I断片に連結された。得られたプラスミドはp192と命名された（図4e）。

【0058】

実施例5. 細胞のトランスフェクション

EPOの生産のために種々の細胞株が選択され、ターゲッティングベクターでトランスフェクトされた。

【0059】

5.1. Nama Iwa細胞

細胞はT150組織培養ボトル中で増殖させ、エレクトロポレーション (1×10^7 細胞/ $800 \mu\text{l}$ エレクトロポレーション緩衝液20 mM Hepes、138 mM NaCl、5 mM KC1、0.7 mM Na₂HPO₄、6 mM D-グルコース1水和物pH 7.0、10 μg 線状DNA、960 μF 、260 V BioRad Gene Pulser) によってトランスフェクトした。エレクトロポレーション後、RPMI 1640、10% (v/v) ウシ胎仔血清 (FCS)、2 mM L-グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウム中で、40枚の96ウェルプレート中で細胞を培養した。2日後に、G-418を含む培地1 mg/ml中で細胞を10~20日間培養した。上清は、固相ELISAによってEPOの生産を試験した（実施例1.4参照）。EPOを生産するクローニングは24ウェルプレートおよびT-25組織培養ボトルで増殖させた。一部を凍結し、細胞はFACSによってサブクローニングされた (Vantage、Becton Dickinson)。サブクローニングは、EPO生産について試験を繰り返した。

【0060】

5.2. HT 1080細胞

HT 1080細胞はDMEM、10% (v/v) FCS、2 mM L-グルタミン、1 mMピルビン酸ナトリウム中で培養されたという以外は、条件はNama Iwa細胞で記述されたとおりである。エレクトロポレーションによるトランスフェクションのために、細胞をトリプシン処理によって培養器の壁からはがした。エレクトロポレーション後、 1×10^7 細胞は、5枚の96ウェルプレート上で、DMEM、10% (v/v) FCS、2 mM L-グルタミン、1 mMピルビン酸ナトリウム中で培養された。

【0061】

5.3. HeLa S3細胞

HeLaS3細胞はRPMI 1640、10% (v/v) FCS、2 mM L-グルタミン、1% (v/v) NEM 非必須アミノ酸 (Sigma社) 、および1 mMピルビン酸ナトリウム中で培養されたという以外は、条件はNama Iwa細胞で記述されたとおりである。エレクトロポレーションによるトランスフェクションのために、細胞をトリプシン処理によって培養器の壁からはがした。エレクトロポレーションの条件は960 μ F/250 Vだった。エレクトロポレーション後、細胞は、RPMI 1640、10% (v/v) FCS、2 mM L-グルタミン、1% (v/v) NEM、および1 mMピルビン酸ナトリウム中で、T75組織培養ボトルで培養された。エレクトロポレーションの24時間後、細胞をトリプシン処理して、10枚の96ウェルプレート上で、600 μ g/mlのG-418を含む培地中で10~15日培養した。

【0062】

実施例6. EPO遺伝子増幅

EPO発現を増加させるために、EPO生産クローンは、メトトレキセート (MTX) の濃度を上昇させながら (100 pM~100 nM) 、培養した。各MTX濃度で、クローンのEPO生産はELISAによって確認された (実施例1.4参照) 。強い生産細胞は、限界希釀によってサブクローニングした。

【0063】

実施例7. EPO生産細胞株の解析

EPO遺伝子の活性化には、3つの細胞株 (Nama Iwa、HeLa S3、およびHT 1080)

が選択された。EPO生産クローンは、プラスミドp179、p187、p189、p190またはp192のトランスフェクションによって得られた（実施例2および3参照）。

【0064】

約160,000のNEO耐性クローンのEPO生産が試験され、そのうち12から15が細胞上清にかなりの収量でEPOを繰り返し分泌していた。

【0065】

これらのうち、7つのEPOクローンが、驚くべきことにMTXによる遺伝子増幅なしに同定され、大量の産業用生産に十分な量のEPOを生産していた。これらのクローンのEPO生産は、24時間で 10^6 細胞あたり、200 ng/mlから1000 ng/ml以上までの範囲だった。

【0066】

500 nMのMTXによる遺伝子増幅後、同定されたEPOクローンのEPO生産は、24時間で 10^6 細胞あたり3000 ng/ml以上に増加した。MTX濃度を1000 nMまでさらに増加させると、生産は24時間で 10^6 細胞あたり7000 ng/ml以上に増加した。

【0067】

得られたクローンは、無血清培養条件およびMTXの非存在下でも、EPO生産を示した。

【配列表】

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
- (B) STRASSE: Sandhofer Str. 112-132
- (C) ORT: Mannheim
- (D) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 68305

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Identifizierung humaner Zelllinien zur Produktion humaner Proteine durch endogene Genaktivierung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZICHEN:

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGCGGGCGGAT CCCAGGGAGCC TGGGTTGACC GG

32

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GGCCGCGAAT TCTCCGCGCC TGGCCGGGT CCCTCAGC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CGCGGGCGGAT CCTCTCCTCC CTCCCAAGCT GCAATC

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GGCCCGCGAAT TCTAGAACAG ATAGCCAGGC TGAGAG

36

【図面の簡単な説明】

【図1】

5'非翻訳配列、エクソン1、およびインtron1の領域からのEPO遺伝子の相同領域の増幅を模式的に表した図である。

【図2】

5'非翻訳配列、エクソン1、およびインtron1の領域からの相同領域を含むプラスミドを模式的に表した図である。

【図3】

ラウス肉腫ウイルスプロモーター(RSV)、ネオマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子(NEO)、SV40の初期ポリアデニル化領域(SVI pA)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子(DHFR)のSV40初期プロモーター、およびサイトメガロウイルスの極初期プロモーターおよびエンハンサー(MCMV)を含む遺伝子活性化配列を模式的に表した図である。

【図4 a】

EPO遺伝子ターゲッティングベクターp176の生産。

【図4 b】

EPO遺伝子ターゲッティングベクターp179およびp187の生産。

【 4 c】

EPO遺伝子ターゲッティングベクターp189の生産。

[4 d]

EPO遺伝子ターゲッティングベクターp190の生産。

(☒ 4 e)

EPO遺伝子ターゲッティングベクターp192の生産。

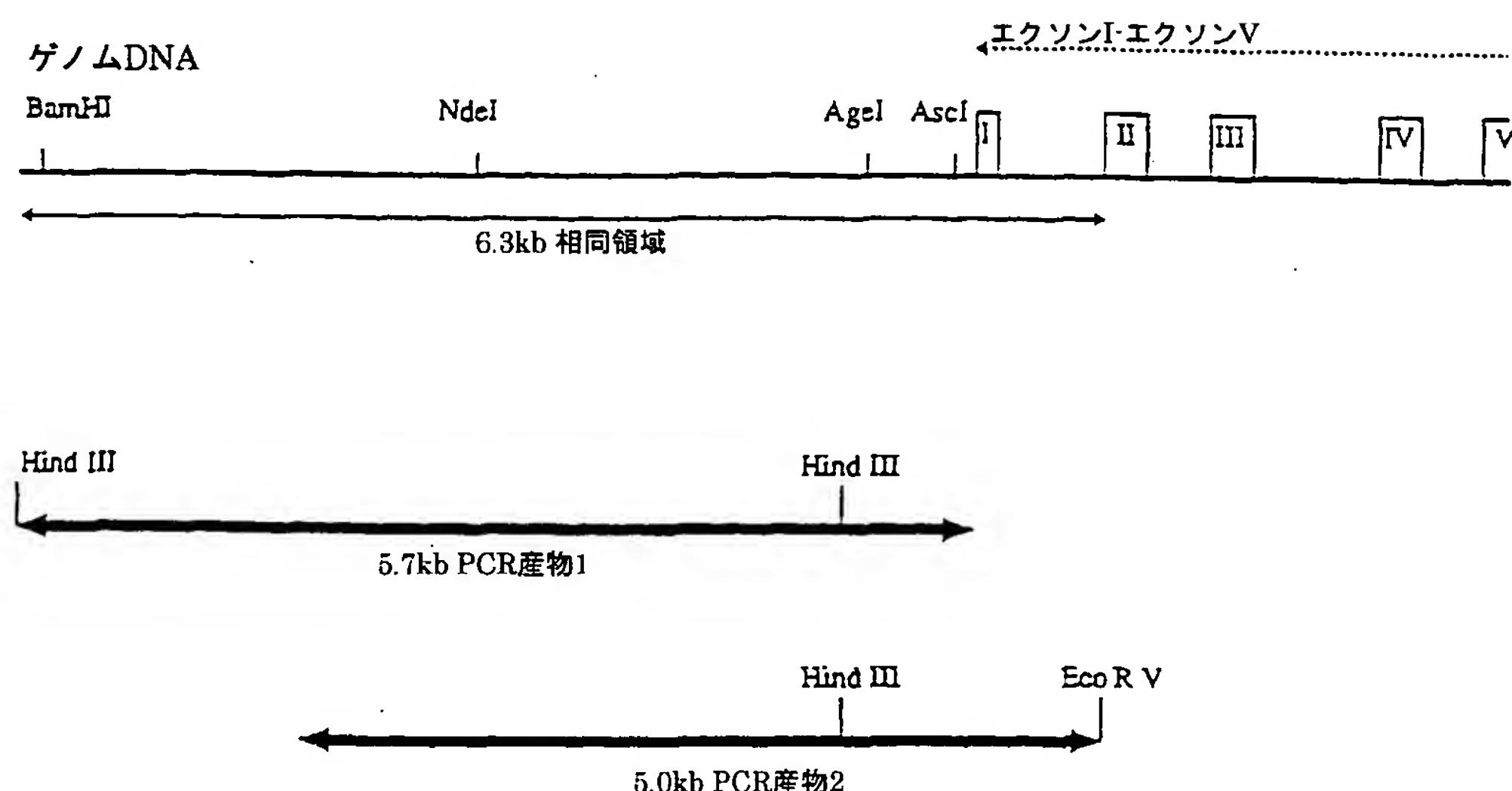
【配列番号：1および配列番号：2】

PCR産物1の作製に使用したプライマーのヌクレオチド配列（図1）。

【配列番号：3および配列番号：4】

PCR産物2の作製に使用したプライマーの配列（図1）。

【四】



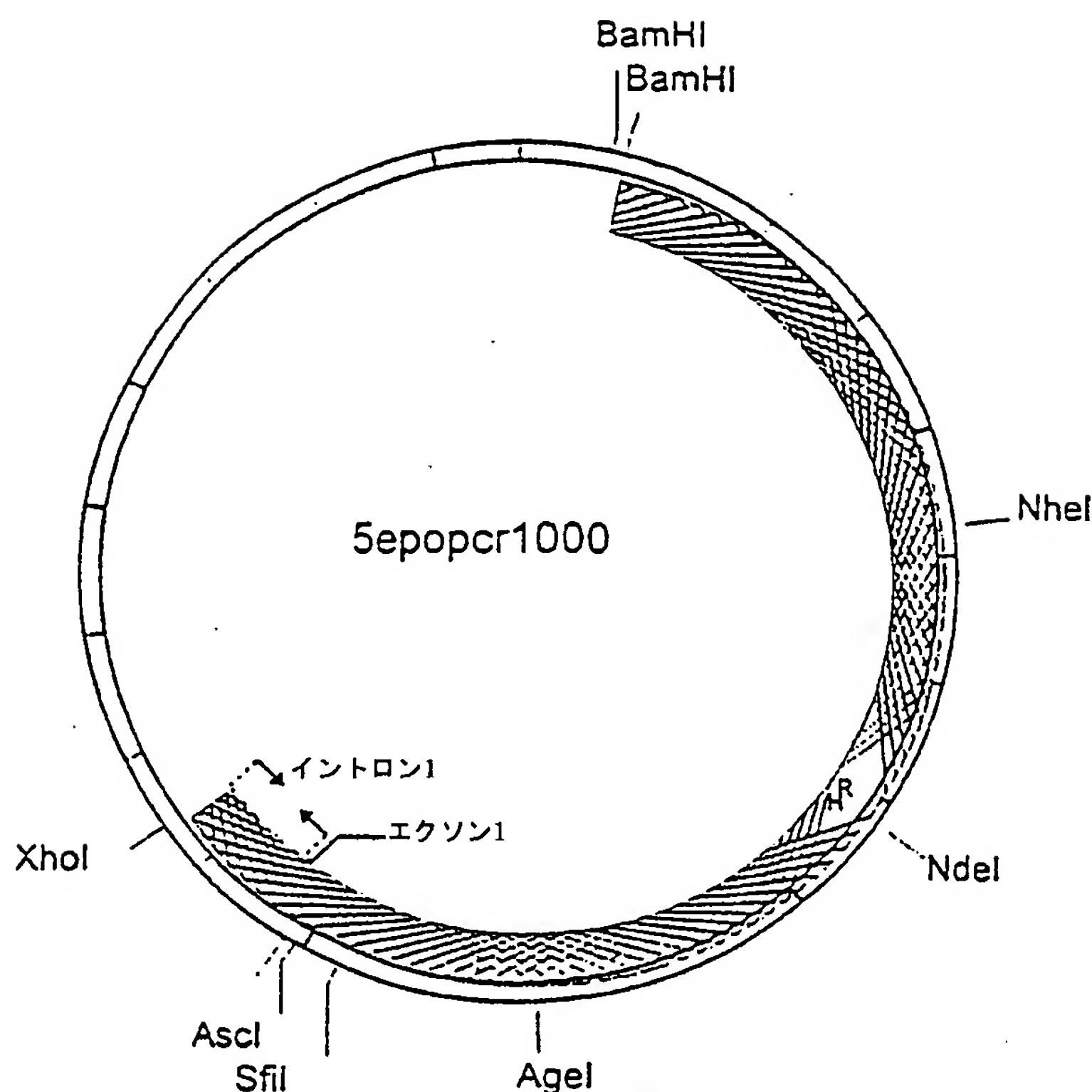
PCR産物1のためのプライマー：

5' CGC GGC GGA TCC CAG GGA GCT GGG TTG ACC GG 3'
5' GGC CGC GAA TTC TCC GCG CCT GGC CGG GGT CCC TCA GC 3'

PCR産物2のためのプライマー：

5' CGC GGC GGA TCC TCT CCT CCC TCC CAA GCT GCA ATC 3'
5' GGC CGC GAA TTC TAG AAC AGA TAG CCA GGC TGA GAG 3'

【図2】



ベクターにクローニングされたEPO遺伝子の6kbゲノムDNA

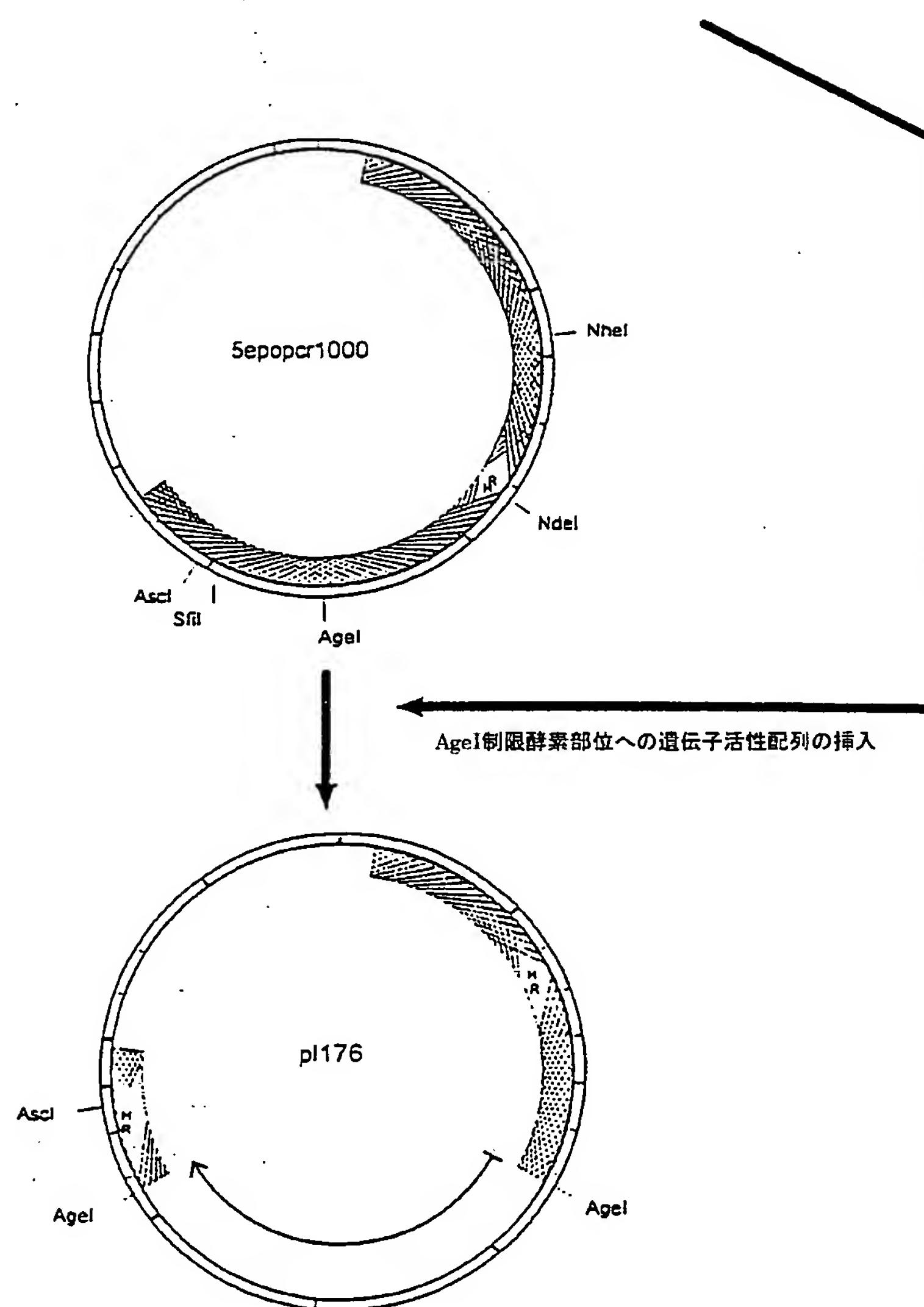
【図3】

遺伝子活性化配列：

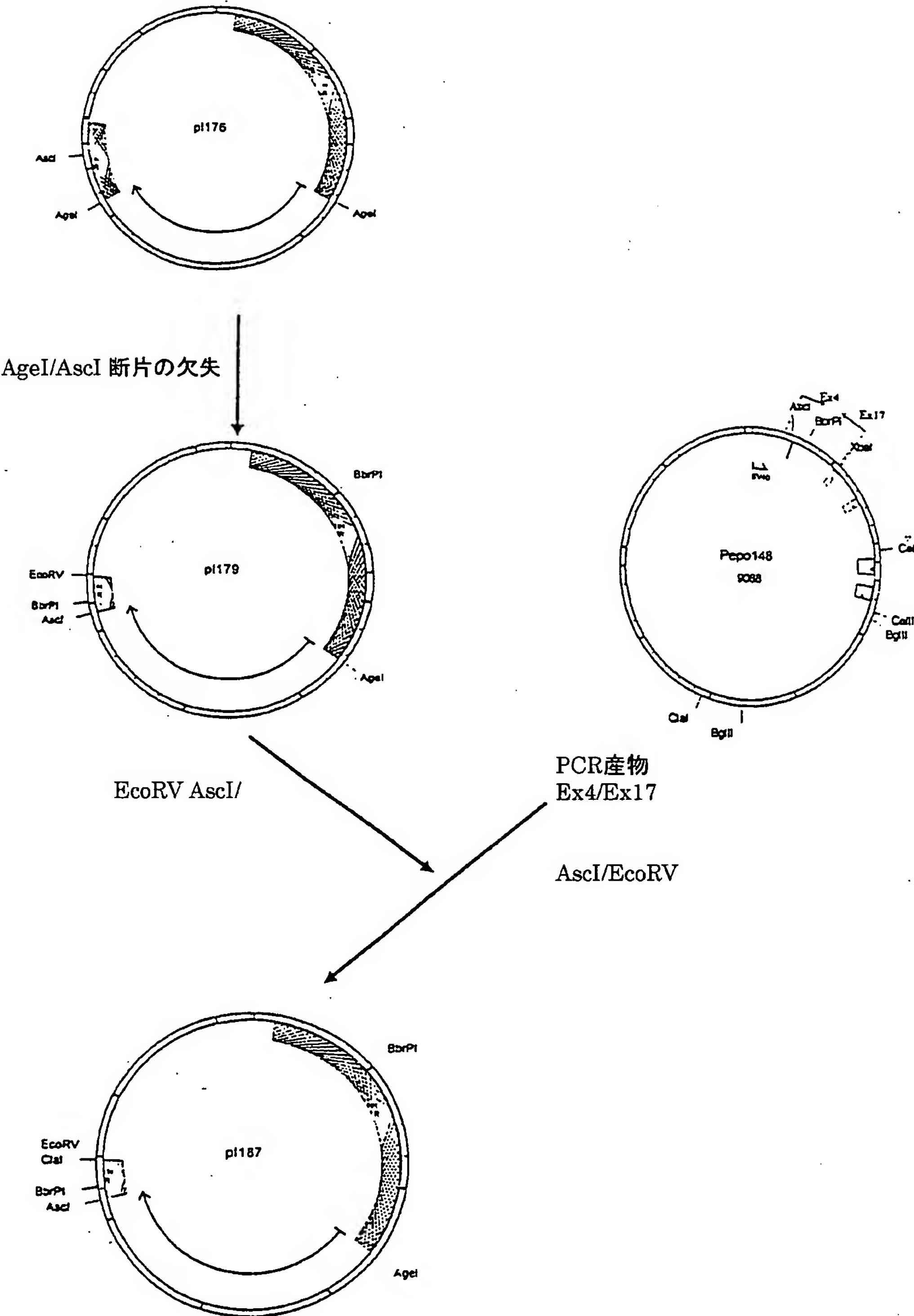


【図4a】

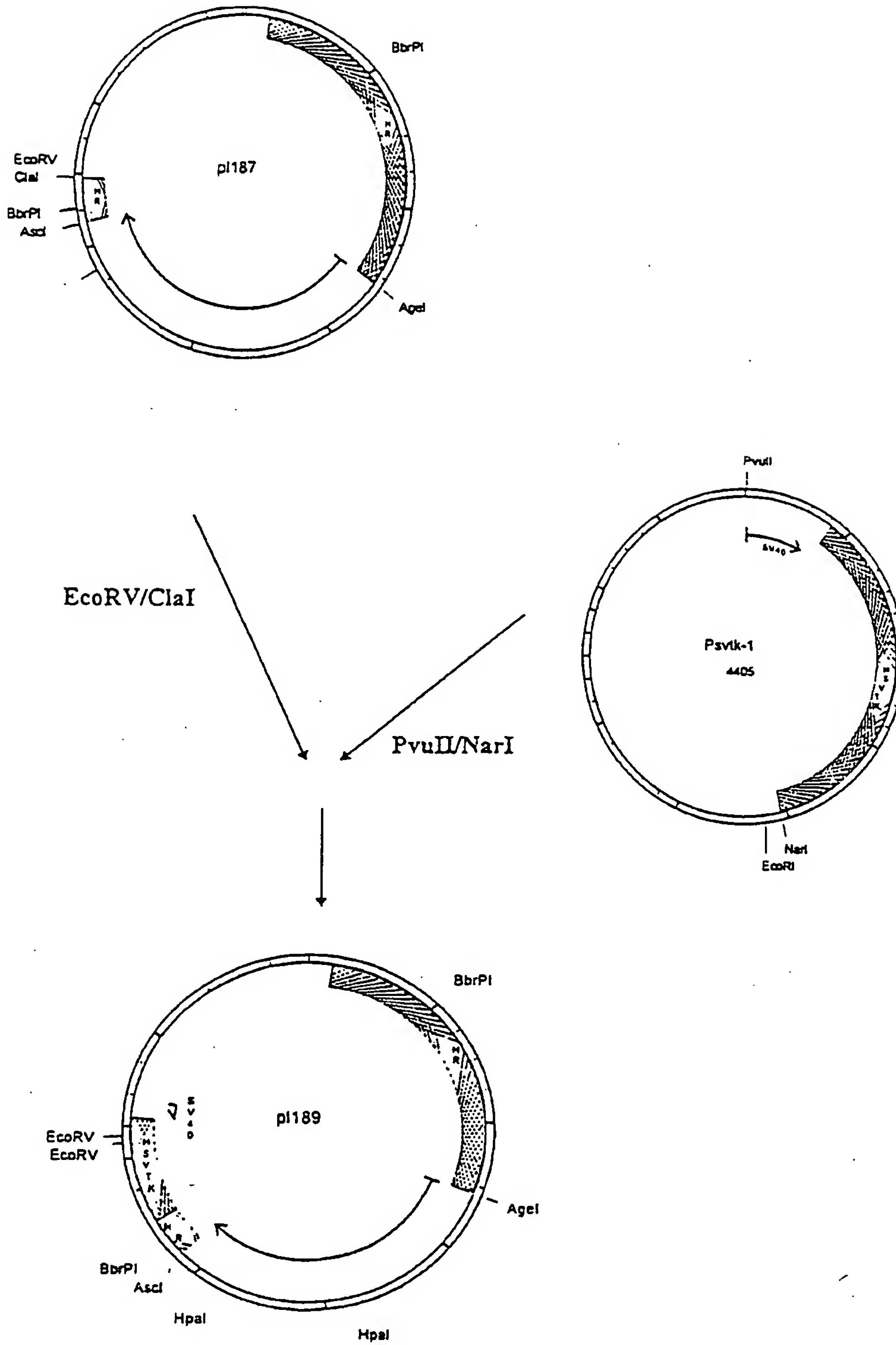
遺伝子活性化配列：



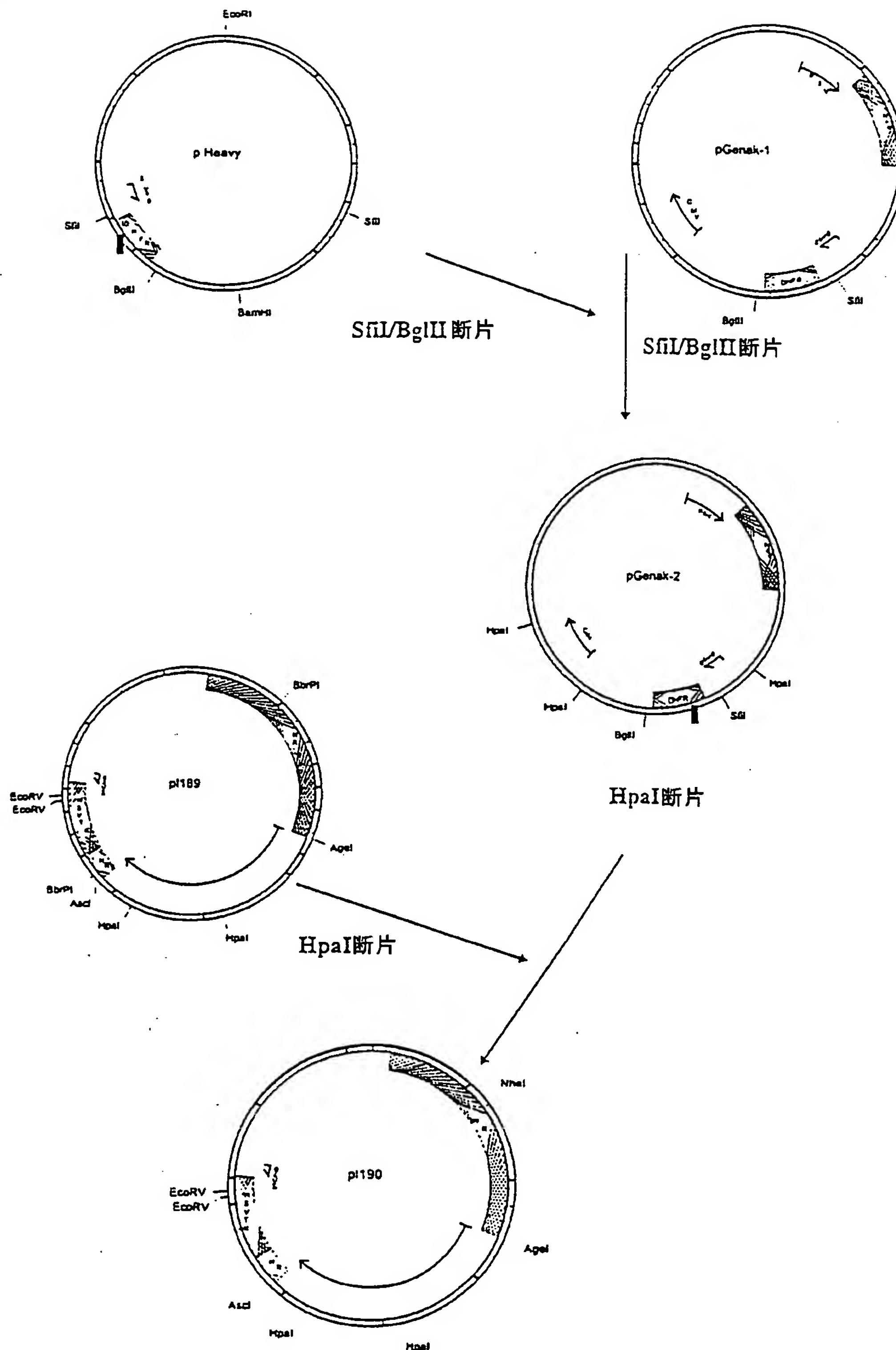
【図4 b】



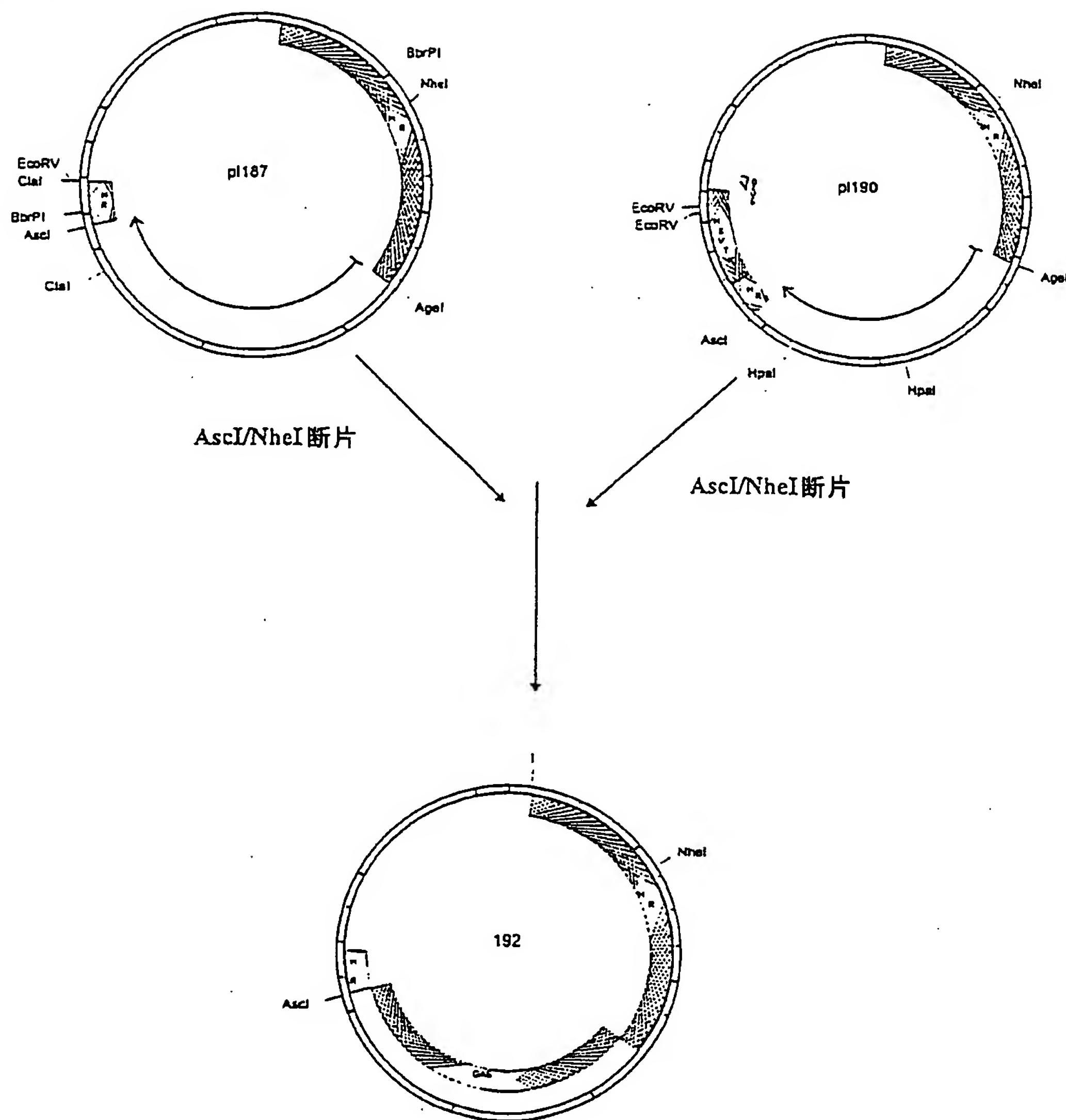
【図4c】



【図4d】



【図4 e】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Appl. No.
PCT/EP 98/04584

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/12 C12N15/85 C12N15/10 C07K14/505		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 267 678 A (INTEGRATED GENETICS INC) 18 May 1988 see page 5, line 54 - page 6, line 2 ---	1-15
A	EP 0 232 034 A (SUMITOMO CHEMICAL CO ;SUMITOMO PHARMA (JP)) 12 August 1987 see page 11, line 23 - page 16, line 31; claims 1-4 ---	1-15
A	EP 0 411 678 A (GENETICS INST) 6 February 1991 see page 10, line 39 - line 49 ---	1-15
A	EP 0 747 485 A (CELL GENESYS INC) 11 December 1996 see the whole document ---	1-15 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 January 1999	Date of mailing of the international search report 14/01/1999	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 MV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hornig, H	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte
end Application No
PCT/EP 98/04584

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 29411 A (TRANSKARYOTIC THERAPIES INC ;TRECO DOUGLAS A (US); HEARTLEIN MICHA) 26 September 1996 see the whole document	1-15
A	WO 95 31560 A (TRANSKARYOTIC THERAPIES INC ;TRECO DOUGLAS A (US); HEARTLEIN MICHA) 23 November 1995 cited in the application see the whole document	1-15
A	WO 94 12650 A (TRANSKARYOTIC THERAPIES INC) 9 June 1994 cited in the application see the whole document	1-15
A	WO 93 09222 A (TRANSKARYOTIC THERAPIES INC) 13 May 1993 cited in the application see the whole document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l Application No
PCT/EP 98/04584

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0267678	A	18-05-1988	US 4954437 A		04-09-1990
			AU 7842987 A		16-03-1989
			DK 478287 A		16-03-1988
			FI 873897 A		16-03-1988
			JP 63185396 A		30-07-1988
			PT 85699 B		31-08-1990
EP 0232034	A	12-08-1987	JP 62171696 A		28-07-1987
			DE 3780179 A		13-08-1992
EP 0411678	A	06-02-1991	AU 621535 B		19-03-1992
			AU 5313486 A		01-07-1986
			CZ 8508804 A		14-08-1996
			DE 3585161 A		20-02-1992
			DK 368786 A		01-08-1986
			DK 610784 A		16-08-1985
			EP 0205564 A		30-12-1986
			FI 863044 A		24-07-1986
			GR 852890 A		03-04-1986
			HK 105593 A		15-10-1993
			HK 105693 A		15-10-1993
			JP 1257480 A		13-10-1989
			JP 6055144 B		27-07-1994
			JP 2104284 A		17-04-1990
			JP 10052266 A		24-02-1998
			JP 2000442 A		05-01-1990
			JP 9107978 A		28-04-1997
			JP 2693361 B		24-12-1997
			JP 6189758 A		12-07-1994
			JP 2648301 B		27-08-1997
			JP 61012288 A		20-01-1986
			JP 7184681 A		25-07-1995
			JP 1044317 B		27-09-1989
			JP 62501010 T		23-04-1987
			LT 1481 A, B		26-06-1995
			LV 10505 A		20-02-1995
			LV 10505 B		20-04-1996
			LV 10507 A		20-02-1995
			LV 10507 B		20-06-1996
			MD 940371 A		28-06-1996
			PT 81590 B		20-10-1987
			SG 93993 G		25-02-1994
			SG 94093 G		25-02-1994
			WD 8603520 A		19-06-1986
			SU 1672930 A		23-08-1991
			DD 279687 A		13-06-1990
			MD 95 B		30-11-1994
			MX 9203298 A		01-07-1992
			SU 1801118 A		07-03-1993
EP 0747485	A	11-12-1996	AT 139574 T		15-07-1996
			AU 635844 B		01-04-1993
			AU 7740791 A		31-05-1991
			CA 2045175 A		07-05-1991
			DE 69027526 D		25-07-1996
			DE 69027526 T		05-12-1996
			DK 452484 T		14-10-1996
			EP 0452484 A		23-10-1991

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/04584

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0747485 A		ES 2090297 T GR 3021105 T JP 4505104 T WO 9106666 A WO 9106667 A US 5578461 A	16-10-1996 31-12-1996 10-09-1992 16-05-1991 16-05-1991 26-11-1996
WO 9629411 A	26-09-1996	US 5733746 A AU 5362596 A CA 2215618 A EP 0815232 A	31-03-1998 08-10-1996 26-09-1996 07-01-1998
WO 9531560 A	23-11-1995	US 5641670 A AU 2550495 A BR 9507874 A CA 2190289 A CN 1119545 A CZ 9603258 A EP 0759082 A FI 964536 A HU 76844 A JP 10500570 T NO 964802 A NZ 285945 A SK 146196 A US 5733746 A ZA 9503879 A	24-06-1997 05-12-1995 19-08-1997 23-11-1995 03-04-1996 17-12-1997 26-02-1997 09-01-1997 28-11-1997 20-01-1998 09-01-1997 25-03-1998 04-02-1998 31-03-1998 18-01-1996
WO 9412650 A	09-06-1994	AU 689455 B AU 5736294 A AU 5840198 A CA 2151032 A EP 0672160 A JP 8503856 T MX 9307623 A NZ 259165 A SG 46476 A US 5641670 A US 5733746 A US 5733761 A	02-04-1998 22-06-1994 04-06-1998 09-06-1994 20-09-1995 30-04-1996 30-06-1994 26-01-1998 20-02-1998 24-06-1997 31-03-1998 31-03-1998
WO 9309222 A	13-05-1993	AT 155810 T AU 669499 B AU 3069892 A AU 6563196 A DE 69221168 D DE 69221168 T DK 649464 T EP 0649464 A EP 0750044 A ES 2106891 T GR 3025054 T JP 7500969 T MX 9206376 A NZ 245015 A NZ 270805 A NZ 270864 A PT 101031 A	15-08-1997 13-06-1996 07-06-1993 28-11-1996 04-09-1997 26-02-1998 02-03-1998 26-04-1995 27-12-1996 16-11-1997 30-01-1998 02-02-1995 28-02-1994 21-12-1995 24-10-1997 24-10-1997 28-02-1994

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l Application No
PCT/EP 98/04584

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9309222 A		SG 44652 A	19-12-1997
		US 5641670 A	24-06-1997
		US 5733746 A	31-03-1998
		US 5733761 A	31-03-1998

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1992)

page 3 of 3

フロントページの続き

(31) 優先権主張番号 09/113,692
(32) 優先日 平成10年7月10日(1998.7.10)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY,
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I
T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ
, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML
, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K
E, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM
, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG
, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, D
K, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR
, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP
, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, L
V, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ
, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI
, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, U
S, UZ, VN, YU, ZW

(72) 発明者 ペサラ ウルリッヂ
ドイツ国 エイルヘイム バレンムフル
1
F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA21 CA04 DA02
EA04 FA02 GA11 HA01 HA11
4B065 AA93X AA93Y AB01 BA03
CA24 CA44 CA46

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.